



|                  |   |
|------------------|---|
| Title            | アメマスのピテロゲニンと卵黄蛋白  |
| Author(s)        | 原, 彰彦; 松原, 孝博; 実吉, 峯郎; 高野, 和則   |
| Citation         | 北海道大學水産學部研究彙報, 35(3), 144-153   |
| Issue Date       | 1984-08   |
| Doc URL          | <a href="http://hdl.handle.net/2115/23856">http://hdl.handle.net/2115/23856</a> |
| Type             | bulletin (article)  |
| File Information | 35(3)_P144-153.pdf  |



[Instructions for use](#)

アメマスのピテロゲニンと卵黄蛋白\*

原 彰彦\*\* ・松原 孝博\*\*\*  
実吉 峯郎\*\*\*\* ・高野 和則\*\*\*

Vitellogenin and Its Derivatives in Egg Yolk Proteins of  
Whitespotted Char (*Salvelinus leucomaenis*)\*

Akihiko HARA\*\*, Takahiro MATSUBARA\*\*\*, Mineo SANEYOSHI\*\*\*\*  
and Kazunori TAKANO\*\*\*

Abstract

Vitellogenin and its derivatives in egg yolk proteins of whitespotted char (*Salvelinus leucomaenis*) were studied immunologically. Vitellogenin was purified from the serum of mature female fish with hydroxylapatite column chromatography followed by gel filtration on Sepharose 6B. Two egg yolk proteins, E1 and E2, were also isolated from the egg yolk by gel filtration. These three preparations were highly pure immunologically.

Vitellogenin was considered to be composed of two egg yolk proteins, E1 and E2. Two female-specific serum proteins were identified in mature female and estrogen-treated fish sera by immunoelectrophoresis using rabbit antiserum against vitellogenin. One of the female-specific serum proteins was considered to be identical with the vitellogenin, composed of a complex of E1 and E2. The other seemed to be a fragment of vitellogenin, since it was deficient in E1 antigenicity but had E2 antigenicity. It was concluded that two female-specific proteins found in the serum represent each a complex of E1+E2 (vitellogenin) and a free E2 (a fragment of vitellogenin).

When determination of vitellogenin amount was carried out using antiserum against the vitellogenin, free E2 was also determined in addition to the vitellogenin. The precise amount of vitellogenin in serum, therefore, should be determined with antiserum specific to E1. The procedure was shown to be useful and practical for determination of vitellogenin amount in fish serum during the preovulatory and postovulatory periods, and for estrogen-treated fish.

今世紀の初め、Uhlenhuth・児玉(1914)は免疫学的沈降法を各種動物の血液鑑定に応用した研究の中で、成熟卵をもつコイ雌の血液中に、コイ卵抽出液を免疫して得た家兎血清と反応して沈降する物質が存在するを見だし、この物質をオヴミン(ovumin)と命名した。同様の方法

\* 北海道大学水産学部七飯養魚実習施設業績第22号  
(Contribution No. 22 from the Nanae Fish Culture Experimental Station, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

\*\* 北海道大学医学部生化学第一講座, 現所属 養殖研究所  
(Department of Biochemistry, Hokkaido University School of Medicine. Present address: Inland Station, National Research Institute of Aquaculture, Tamaki, Watarai, Mie 519-04, Japan)

\*\*\* 北海道大学水産学部淡水増殖学講座  
(Laboratory of Fresh-Water Fish-Culture, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

\*\*\*\* 北海道大学薬学部薬品有機化学講座  
(Division of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University)

を用いて佐久間(1923, 1924)は14種の魚の性差について報告した。その後1960年以降、電気泳動法、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー、超遠心分析法などの各種手法を用いて、多くの魚種で雌特異血清蛋白 (female-specific serum protein(s), 以下 FSSP) の存在することが明らかにされてきた (Wallace, 1978; Wallace & Selman, 1981; Wiegand, 1982)。すでに昆虫では、卵黄形成期の体液に出現する雌特異蛋白がビテロゲン (vitellogenin, 以下 Vg) と称されていた (Pan et al., 1969) ことから、魚類でも一般にこの蛋白質を Vg と呼んでいる。これまでの研究から、魚類の Vg は以下のような性質を有すると考えられる。

- 1) 卵黄形成期の雌血清中に特異的に出現する蛋白である。
- 2) 雄および未熟雌にエストロゲンを投与することによって血中に誘導される。
- 3) カルシウム、鉄を結合する glycolipophosphoprotein で、高分子の複合蛋白である。
- 4) 魚卵抽出液を免疫して得られた抗血清と反応する卵黄蛋白の前駆物質である。

著者らも先に電気泳動法と免疫学的手法を用いて、ニジマス (Hara & Hirai, 1978)、サケ (原, 1978)、ニホンウナギ (Hara et al., 1980) の FSSP を検索し分離精製することによって、これが鳥類や両生類の Vg と同様の蛋白であることを明らかにした。しかし、ニジマスとサケで精製した Vg を家兎に免疫して得た抗 Vg 血清、および成熟雌血清に対する抗血清をそれぞれ雄血清で吸収した吸収抗血清は、成熟雌血清およびエストロゲン処理魚の血清と反応して2本の沈降線を示した。このうち1成分は Vg 分子であり、他の1成分は Vg のフラグメントであろうと考えたが、その詳細については明らかにし得なかった。

このように魚類では卵黄蛋白と Vg、さらには FSSP との関係が必ずしも明確にされていない。今回、アメマスで生化学的、免疫学的な解析を行い、Vg とそのフラグメントについて若干の知見を得た。併せて免疫学的定量法について検討し、本種の排卵前後の雌およびエストロゲン処理魚の血中 Vg 量の測定を試みたので、その結果を報告する。

## 材料と方法

**材料** 実験に用いたアメマス *Salvelinus leucomaenis* (Pallas) は、北海道大学水産学部附属七飯養魚実習施設および同、洞爺湖臨湖実験所において飼育された個体と、道央の積丹川で適宜釣獲後、実験室内で脱塩素水 (亜硫酸ソーダ, DJ-6847, 第一製薬 KK) を用い水槽飼育したものである。

エストロゲン処理は、雄および未熟雌魚を用い、布村ら (1983) に従って行った。あらかじめエタノールに溶解し、等量の 0.9% NaCl で希釈したエストラジオール-17 $\beta$  を、魚体重 1 kg 当り 1 mg、腹腔内に単一注射した後、7日目と10日目に血液を採取した。採血方法と血清の分離も、布村ら (1983) に準じて行った。

**Vg と卵黄蛋白の精製** Vg は産卵期の雌から得た血清 3 ml に phenylmethylsulfonylfluoride を 0.01% 加えて出発材料とし、サケ Vg の精製法 (原, 1978) と同様にハイドロキシルアパタイトカラム, Sepharose 6B のゲル濾過法を用いて分離した。ハイドロキシルアパタイトカラムは 0.4M リン酸カリウム緩衝液 (KP), pH6.8 および 1.2M KP, pH6.8 によって溶出した。ゲル濾過は 2% NaCl を含む 0.02M Tris-HCl 緩衝液, pH8.0 で行った。

卵黄蛋白の精製は、ニジマスの卵黄蛋白 E1, E2 の精製法 (Hara & Hirai, 1978) に準じて行った。すなわち、完熟未受精卵の 0.9% NaCl 抽出液を材料とし、水を加えて生じた沈殿物を Tris-HCl 緩衝液, pH8.0 に溶解後、同緩衝液で平衡化した Sephadex G-200 のゲル濾過カラムに添加して卵黄蛋白 E1 および E2 を分画した。E1 分画はさらに上記 Tris-HCl 緩衝液により Sepharose 6B で再度ゲル濾過して分離した。

**抗血清** アメマスの成熟雌血清、雄血清および卵黄抽出液に対する家兎抗血清は、前報(原, 1978)の方法に従って作製した。また Vg と卵黄蛋白 (E1, E2) に対する特異抗血清は、それぞれ前項で述べた精製品を抗原として、1 週間隔で計 4 回、家兎に免疫して得た。毎回の投与量は、抗原約 200 $\mu$ g を含む蛋白溶液 0.5 ml に等量の complete adjuvant (Freund) を混合して全量 1 ml とし、家兎の背部に皮下注射した。

**免疫学的方法** 免疫電気泳動には 1.2% アガロースを用い、0.05M ペロナル緩衝液、pH8.6 で泳動した。Ouchterlony 法および Mancini 法は、0.9% NaCl に 1.2% 濃度でアガロースを加熱溶解し、直径 9 cm のペトリシャーレに厚さ 1 mm の寒天板を作製して行った。Mancini 法による血清中の Vg 量は、あらかじめ既知量の精製 Vg (592  $\mu$ g/ml) の 6 段階希釈溶液を作り、検量線を求めてから測定した。なお Vg の蛋白量はウシ血清アルブミンを標準品として Folin-Lowry 法で測定し決定した。

## 結 果

### Vg, E1 および E2 の精製

成熟雌血清のハイドロキシルアパタイトカラムによって得た分画の免疫電気泳動パターンを図 1 に示した。0.4M KP, pH6.8 では血清蛋白の大部分が溶出したのに対し、1.2M KP, pH6.8 では Vg 以外の血清蛋白はほとんど溶出しなかった。また、1.2M KP, pH6.8 による溶出分画の Sepharose 6B のゲル濾過パターンは左右対称の 1 ピークを示し、その溶出位置は分子量 60 万のサケ Vg (原, 1978) と同様であった。このピークの分画からアメマス Vg の精製品を得た。精製品は抗雄血清とは全く反応せず、抗 Vg 血清および抗雌血清とは 1 本の沈降線を示したことから、免疫学的に高純度であることが確認された。

図 2 には卵黄蛋白抽出液を水で沈殿させて得た蛋白の Sephadex G-200 による溶出パターンを示した。図のように void-volume に小さな第 1 ピーク、これに続いて最大の第 2 ピーク、そして試験管番号 47 に極大値を示す第 3 ピークが得られた。これらのうち第 2 ピーク (試験管番号 26 ~ 30) を収集して濃縮した後、Sephadex 6B のゲル濾過によって単一のピークを得、これを精製 E1 とした。E2 は Sephadex G-200 の第 3 ピーク (試験管番号 45 ~ 49) を直接集めて精製品とした。なお Sephadex G-200 による E1 と E2 の溶出位置は、先のニジマス (Hara & Hirai, 1978) の E1 (分子量 30 万)、E2 (分子量 3.5 万) の溶出位置と同じであった。このようにして得たアメマスの精製 E1 と E2 の免疫電気泳動像を図 3 に示した。精製 E1 は抗卵黄抽出液血清および抗 E1 血清に対して、それぞれ 1 本の沈降線を示した。一方、E2 は形成された沈降線から、易動度の異

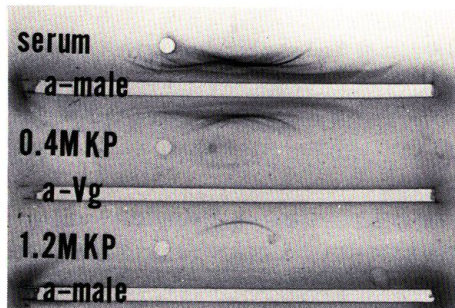


Fig. 1. Immuno-electrophoresis of the fraction of whitespotted char serum obtained from the hydroxylapatite column. serum: mature female serum; 0.4 M KP: fraction eluted with 0.4 M potassium phosphate buffer, pH 6.8; 1.2 M KP: fraction eluted with 1.2 M potassium phosphate buffer, pH 6.8; a-male: rabbit anti-serum against male serum; a-Vg: rabbit anti-serum against purified vitellogenin.

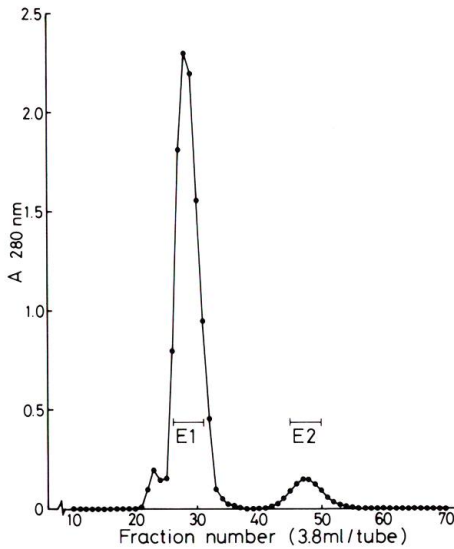


Fig. 2. Gel filtration profile on Sephadex G-200 of water-insoluble proteins isolated from whitespotted char egg yolk. Fraction of E1 as indicated by a bar was further fractionated by Sepharose 6B gel filtration and purified E1 was obtained. Fraction of E2 as indicated by a bar was collected as purified E2.

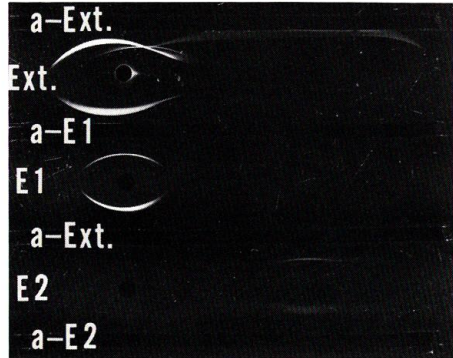


Fig. 3. Immunoelectrophoresis of purified E1 and E2 from whitespotted char egg yolk. Ext: egg yolk proteins extracted with 0.9% NaCl; E1: purified E1; E2: purified E2; a-Ext: rabbit antiserum against egg yolk extracts; a-E1: rabbit antiserum against purified E1; a-E2: rabbit antiserum against purified E2.

なる3成分から成ることが推察されたが、これらはすべて同一の抗原性を有していた。

#### Vg と E1, E2 との関係

抗 Vg 血清を用いて、精製 Vg と精製 E1 および E2 の抗原性を比較した Ouchterlony 法の結果を図4に示した。Vg の沈降線は E1 および E2 で生じた沈降線の上にスパー (spur) を形成し、一方、E1 と E2 の沈降線は互いに交差 (cross) した。これらの結果から、血清中の Vg は互いに抗原性の異なる卵黄蛋白、E1 と E2 をその分子内に有するものと推察された。

#### 血清中の FSSP

精製 Vg と抗 Vg 血清との Ouchterlony 法による反応(図4)および免疫電気泳動の結果では、いずれも両者の間に1本の沈降線のみが観察された。これに対して成熟雌血清およびエストロゲン処理魚血清と、抗 Vg 血清との間には、しばしば2本の沈降線が形成された(図5)。図5から明らかのように、これらの2成分は易動度をほぼ同じくし、抗原側の濃い沈降線と、その外側のやや薄い沈降線として観察された。さらに同じ血清を、抗 E1 血清および抗 E2 血清と反応させた結果が図6である。抗 Vg 血清に対して2本の沈降線を示した血清は、抗 E1 血清および抗 E2 血清に対しては、それぞれ1本の沈降線のみを生じた。一方、この血清を4℃下で約1か月保存した後、再び同様に免疫電気泳動を行った。その結果は図7に模式的に示したように、抗 Vg 血清に対しては2本の沈降線を生じたものの、図5で抗血清側に見られた沈降線が陽極側により速く移動し、抗原側の沈降線とはスパーを形成した。また抗 E1 血清に対しては、図5の抗原側の沈降線と

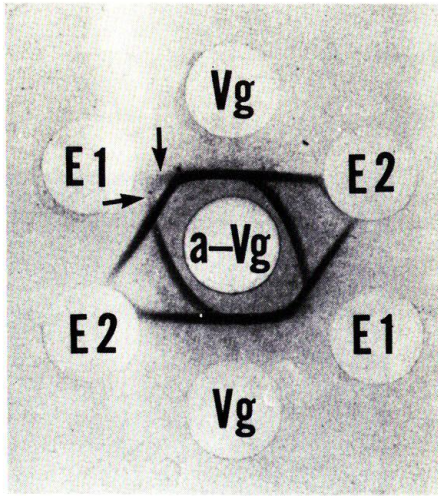


Fig. 4. Precipitin reaction of purified vitellogenin (Vg), E1 and E2. Vg formed a spur over E1 and E2 (arrows). a-Vg: rabbit antiserum against purified vitellogenin.

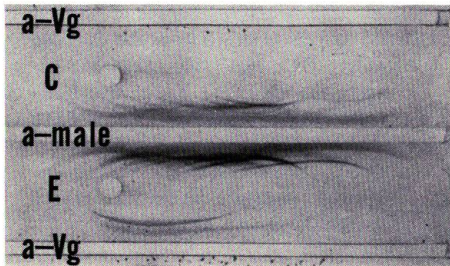


Fig. 5. Immunoelectrophoresis of estrogen-treated whitespotted char. The antigen wells were filled with serum collected from control fish (C) and 7 days after administration of estrogen (E). Antisera used were antiserum against male serum (a-male) and antiserum against vitellogenin (a-Vg).

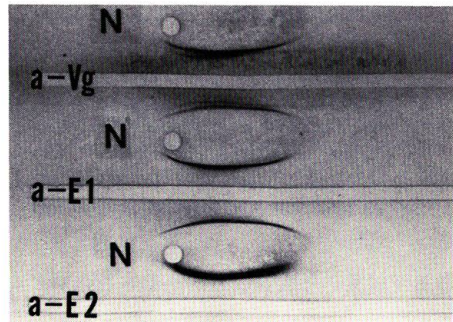


Fig. 6. Immunoelectrophoresis of estrogen-treated whitespotted char (N). a-Vg, a-E1, a-E2: same as in Figs. 1 and 3.

同様の易動度をもつ1本の沈降線が観察された。さらに抗 E2 血清との間では、抗 Vg 血清と反応して形成された2本の沈降線が、波形をなして連なる1本の沈降線として認められ、しかもこの成分は免疫学的に同一抗原性 (fuse) を示した。

#### 血清中の Vg 量

本研究で精製した E1 の抗血清を用いて、アママス雌の生殖周期に伴う血中 Vg 量の変化を明らかにする研究の一環として、本種の成熟期から排卵期にかけての血中 Vg 量と、エストロゲン処理によって Vg を誘導した場合の血中 Vg 量を Mancini 法で測定した。なお、プレート内の抗 E1 血清は 2% 濃度で最も明瞭な沈降輪を形成したことから、以下の測定はこの濃度条件で行った。結果は図 8 に取りまとめて示した。先ず 9 月下旬の卵黄形成盛期の雌では、血中 Vg 量は各々 6,200, 10,200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であった。排卵直後の 2 個体では 600, 4,400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  とやや低い値を示し、搾出による

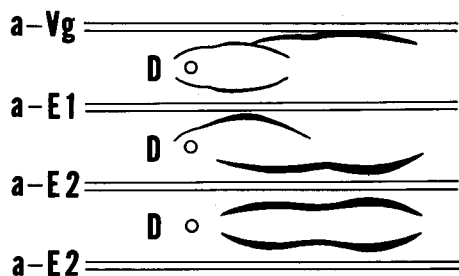


Fig. 7. Immunoelectrophoresis of denatured serum preserved at 4°C for one month. a-Vg, a-E1, a-E2: same as in Figs. 1 and 3.

採卵後 35 日を経過した個体はいずれも 600  $\mu\text{g/ml}$  以下に低減していた。一方、排卵後、体腔内に完熟卵をとどめたまま飼育した場合には、血中 Vg 量のばらつきが目立つが、採卵後の個体と同様、35 日後には全個体が 80  $\mu\text{g/ml}$  以下の極めて低い値になった。またエストロゲン処理魚では、雌雄にかかわらず 7 日後で平均 3,300  $\mu\text{g/ml}$ 、10 日後で 4,700  $\mu\text{g/ml}$  と著しく高い値を示した。

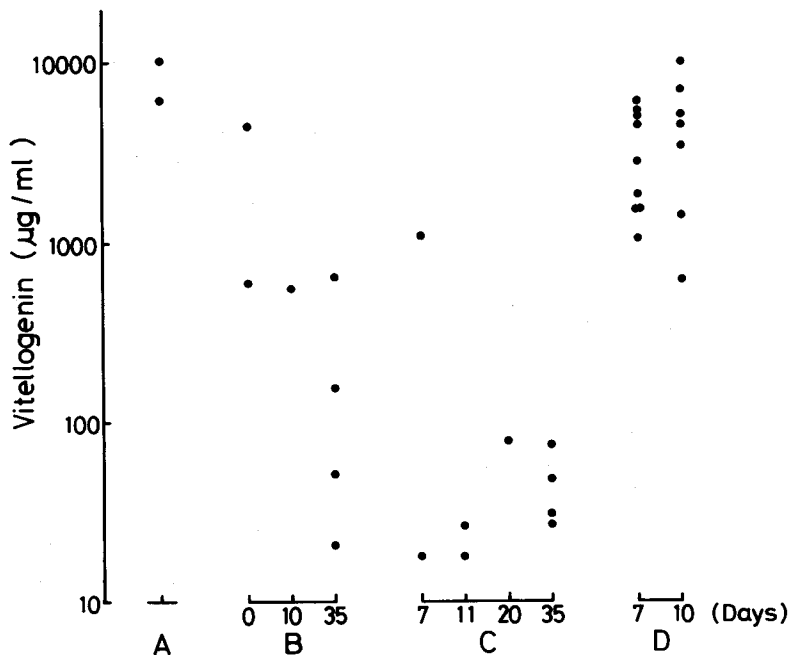


Fig. 8. The concentration of vitellogenin in the serum of female whitespotted char at various maturational stages, and estrogen-treated fish. A: maturing fish; B: 0, 10 and 35 days after ovulation without ripe eggs in the coelom, C: 7, 11, 20 and 35 days after ovulation with ripe eggs in the coelom, D: estrogen-treated fish, 7 and 10 days after estrogen administration.

考 察

魚類の Vg の精製は、これまでサケ (原, 1978), ニジマス (Hara & Hirai, 1978; Campbell &

Idler, 1980), 大西洋サケ (Idler et al., 1979), キンギョ (Hori et al., 1979; de Vlaming et al., 1980), ニホンウナギ (Hara et al., 1980), *Fundulus heteroclitus* (Wallace & Selman, 1982) について行われている。これらの精製法について見ると、ニジマス (Campbell & Idler, 1980) と大西洋サケ (Idler et al., 1979) では水、 $\text{CaCl}_2$  による沈殿法、TEAE\*-セルロースイオン交換、ゲル濾過法で Vg が分離され、キンギョでは diethylformamide による沈殿法 (Hori et al., 1979), あるいは DEAE\*\*-セルロースイオン交換法 (de Vlaming et al., 1980) が用いられている。一方、ニジマス (Hara & Hirai, 1978) では水沈殿法とゲル濾過法により、サケ (原, 1978), ニホンウナギ (Hara et al., 1980) においてはハイドロキシルアパタイトカラム、ゲル濾過法によってそれぞれ高純度の Vg が分離精製されている。今回のアメマスでは、ハイドロキシルアパタイトカラムを用いて免疫学的にも高純度の Vg を得ることができた。上記の各方法のうち、水による沈殿法は、用いる材料魚の血中 Vg 量によって左右されるが、この方法で Vg を沈殿させ得る場合には効率のよい簡便な手法である。例えば先のサケ Vg の精製においては、産卵期の雌を材料とした場合、すでにこの時期の血中 Vg 量が低濃度であるため、水による沈殿法を用いることは困難であった。しかし、同じサケでも卵黄形成が活発に行われている時期の血清を用いれば、ニジマスと同様に水沈殿法で容易に分離できる (原, 未発表)。一方、ウナギの場合には血中 Vg 量が高い時期でも水では沈殿を生じなかった。このように魚類の Vg を水沈殿法で分離する場合には、対象魚種あるいは同種でも時期によって状況を異にする点は注意を要する。なおハイドロキシルアパタイトカラムを用いる方法は、Vg が Ca 結合性リン蛋白であるという性質を利した優れた方法といえる。

両生類・鳥類では血清中の Vg が卵に取り込まれ、卵黄蛋白のリボビテリン (Lv) とホスピチン (Pv) に解裂することが知られている (Wallace, 1978; 大野, 1979, 1981)。一方、魚類においても卵黄から脂質含量の高い Lv 様蛋白 (Markert & Vanstone, 1971; Hara & Hirai, 1978; Campbell & Idler, 1980) と、リン酸に富みセリン含量の高い Pv 様蛋白 (Ito et al., 1963; Barman et al., 1964; Schmidt et al., 1965; Mano & Lipmann, 1966; Markert & Vanstone, 1971; Campbell & Idler, 1980) がそれぞれ精製されているが、これらの卵黄蛋白と血中 Vg との関係については十分に明らかにされていない。わずかにサケ科魚類で、Lv, Pv に加えて  $\beta$ -成分と呼ばれる卵黄蛋白の存在が知られ (Jared & Wallace, 1968; Markert & Vanstone, 1971), この成分が Lv, Pv とともに Vg の解裂によって生じるものと考えられていた (Wiegand, 1982) に過ぎない。先に Hara & Hirai (1978) は、ニジマスの卵黄蛋白から Lv に相当する E1 と Pv, および  $\beta$ -成分を含むとみなされる E2 を分離し、これら 2 つの卵黄蛋白が血中の Vg から解裂することによって生じることを報告した。このうち E2 に関しては、今回のアメマスでもこの分画に免疫学的に異なる 2 成分を検出し得なかったことから、1 つの抗原蛋白 E2 として扱った。また、ニジマスの E2 は、電気泳動像では幅の広い易動度をもつ 1 つの蛋白成分として観察されたのに対し、アメマス E2 は易動度を異なる 3 成分から成る可能性が示された。このように E2 の性状については、なお今後に検討の余地を残している。免疫学的な解析からは以上のような問題点を残しているとはいえ、E2 抗原が E1 抗原とともに Vg の構成成分であることは確かである。従ってアメマスにおいても血中 Vg が卵に取り込まれた後、卵黄蛋白 E1 および E2 に解裂するものと考えられよう。

卵黄形成時の雌血清中に複数の FSSP が存在することは、免疫学的手法を用いてこれまでに cod (Plack et al., 1971), アユ (Aida et al., 1973), *Gobius niger* (Le Menn, 1979) で報告されている。著者の一人は先にニジマス (Hara, 1976), およびサケ (原, 1978) にみられた 2 成分の FSSP のうち、1 成分は鉄結合能を有し、Vg 相当の蛋白であると考えたが、残りの 1 成分については不

\* TEAE: triethylaminoethyl

\*\* DEAE: diethylaminoethyl



明のままであった。今回材料として用いたアメマスにおいても 2 成分の FSSP が認められ、このうち 1 成分は卵黄蛋白の E2 と共通抗原性を有するフラグメントであり、さらにこの成分が血清保存中に電気泳動による易動度を変化させることを見いだした。これらの結果から、血中の FSSP は Vg と遊離の E2 を含むことが示唆され、従って

$$\text{FSSP} = \text{Vg}(\text{E1} \cdot \text{E2 complex}) + \text{free E2}$$

という構成をとるものと考えられた。しかしこの血中の遊離 E2 が卵黄中の E2 と全く同じか否かについては、血清から直接単離した E2 について検討する必要がある。現在までのところ、少なくとも遊離 E1 は血中に見いだされず、何故 E2 のみが血中に遊離の状態で存在するかは不明である。この点に関しては、肝における Vg の合成と血中への放出、さらには卵への取り込みの過程を追う上で興味深い問題になろう。

最近、著者らはメダカ (Hara et al., 1983), エゾメバル\*で、血清中に複数の FSSP が存在することを新たに見だし、しかもこれらのうちのある成分は、卵黄形成期以前の雌血清およびエストロゲン処理魚血清中にも出現することを指摘した。これらの FSSP が、直接卵黄形成とは別に、雌としてのどのような機能と結びついているかに関しては、今後解明を要する課題である。

免疫学的手法を用いた魚類における Vg の定量は、これまでも English sole と Pacific halibut (Utter & Ridgeway, 1967), cod (Plack et al., 1971), pike (Goedmakers & Verboom, 1974), dogfish (Craik, 1978), ブラウントラウト (Crim & Idler, 1978) などで試みられている。これらの測定には Mancini 法, Ouchterlony 法, これに電気泳動法を組み合わせたロケット法, あるいはラジオイムノアッセイなど、免疫学的な多くの手法が用いられている。本研究ではアメマス抗 E1 血清を用い、Mancini 法で血中 Vg の定量を試みた。使用した抗血清の Vg 検出感度は、血中濃度で 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であった。抗血清として抗 Vg 血清を用いると、先に述べた血中の遊離 E2 が抗原抗体反応を起して、しばしば二重の沈降輪が形成されることがあり、従って Vg の測定には抗 E1 血清を使用する方がより適切であると考えた。ラジオイムノアッセイは Mancini 法のおよそ 1,000 倍と高感度ではあるが、一般に魚類の血中 Vg レベルを測定するには、Mancini 法がより簡便かつ十分な方法である。しかし肝組織の培養液や卵黄形成の始動段階における血中の Vg 量など、その濃度が著しく低い ng/ml レベルの場合には、ラジオイムノアッセイが有効であることは勿論である。

アメマスの抗 E1 血清を用いて、主として排卵前後の血清中の Vg レベルを測定した結果、9 月下旬の卵黄形成盛期に高い血中値を示した Vg 量は、排卵後 35 日までなだらかに下降する傾向を示した。Kagawa et al. (1981) は、同じアメマスの排卵前後における血中エストラジオール-17 $\beta$  量の変化について観察し、9 月中旬にピークを示した値が、10 月中旬の排卵前後に急激に下降することを報告している。これらの事実は、卵黄形成終了後、肝における Vg 合成が、血中エストロゲンの急激な減少に遅れて徐々にその活性を低減させることを示している。また、実験結果は排卵後のアメマスの体腔内に完熟卵を長期間とどめておいても、Vg 合成活性、恐らくはこれに係わる内分泌要因にも、取り立てて大きな影響がないことを示唆している。また、未熟魚に対するエストロゲンの単一注射によって、雌雄にかかわらず処理後 1 週間でほぼ成熟期の雌に匹敵するレベルの Vg が誘導されることが明らかにされた。今回得た抗 E1 血清を用いたアメマスの生殖周期に伴う血中 Vg の動態の詳細については、機を改めて報告したい。

## 要 約

アメマス (*Salvelinus leucomaenis*) のピテロゲニン (Vg) および卵黄蛋白を分離精製し、これ

\* 昭和 58 年度日本水産学会春季大会講演

らの関係を免疫学的手法によって解析する目的で実験を行った。産卵期の雌血清から、ハイドロキシルアパタイトカラム, Sepharose 6B のゲル濾過法によって Vg を分離精製した。また、卵黄蛋白からゲル濾過法により、2成分の蛋白 E1 および E2 を精製した。これらの精製品がいずれも高純度であることを免疫学的に確かめた。血清中の Vg と、卵黄蛋白 E1, E2 を免疫学的方法で検討した結果、Vg は抗原性を全く異にする卵黄蛋白 E1 と E2 の複合体であると推定された。一方、家兎に免疫して作製した抗 Vg 血清は、成熟雌およびエストロゲン処理魚の血清と反応して2成分の蛋白の存在を示し、このうち1成分は Vg の全分子、他の1成分は卵黄蛋白 E2 と共通抗原性をもつフラグメントであることが確かめられた。このことから、成熟途上の雌に見られる雌特異血清蛋白 (FSSP) は、Vg とそのフラグメントである遊離の E2 から成ると結論された。また、以上の結果に基づいて、血中 Vg の免疫学的測定には抗 E1 血清を用いることが適当であると考え、主として排卵前後とエストロゲン処理アメマスの血中 Vg 量を測定して、この方法の有用性を確認した。

### 謝 辞

この研究を行うにあたり、実験魚を提供していただいた元北海道大学水産学部教授久保達郎博士、および同学部黒萩 尚助教授に深謝するとともに、保護河川積丹川での材料魚の特別採捕許可をお与え下さった北海道の関係各位に感謝する。また、英文の御校閲をいただいたアメリカ国立海洋漁業局ホノルル支所、George W. Boehlert 博士、実験の技術的な御協力をいただいた米田久美子嬢に厚く御礼申し上げる。なお本研究の一部は文部省科学研究費補助金(57560174)によってなされた。

### 文 献

- Aida, K., Ngan, P.-V. and Hibiya, T. (1973). Physiological studies on gonadal maturation of fishes. I. Sexual difference in composition of plasma protein of ayu in relation to gonadal maturation. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **39**, 1091-1106.
- Barman, T.E., Bai, N.-K. and Thoai, N.-V. (1964). Studies on a herring-egg phosphoprotein. *Biochem. J.* **90**, 555-558.
- Campbell, C.M. and Idler, D.R. (1980). Characterization of an estradiol-induced protein from rainbow trout as vitellogenin by the cross reactivity to ovarian yolk fractions. *Biol. Reprod.* **22**, 605-617.
- Craik, J.C.A. (1978). Plasma levels of vitellogenin in the elasmobranch *Scyliorhinus canicula* L. (lesser spotted dogfish). *Comp. Biochem. Physiol.* **60B**, 9-18.
- Crim, L.W. and Idler, D.R. (1978). Plasma gonadotropin, estradiol, and vitellogenin and gonad phosphitin levels in relation to the seasonal reproductive cycles of female brown trout. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.* **18**, 1001-1005.
- de Vlaming, V.L., Wiley, H.S., Delahunty, G. and Wallace, R.A. (1980). Goldfish (*Carassius auratus*) vitellogenin: induction, isolation, properties and relationship to yolk proteins. *Comp. Biochem. Physiol.* **67B**, 613-623.
- Goedmakers, A. and Verboom, B.L. (1974). Studies on the maturation and fecundity of the pike, *Esox lucius* Linnaeus, 1758. *Aquaculture* **4**, 3-12.
- Hara, A. (1976). Iron-binding activity of female-specific serum proteins of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Biochim. biophys. Acta.* **427**, 549-557.
- 原 彰彦 (1978). サケ血清蛋白の性差ならびにメス特異蛋白の精製. 日水誌 **44**, 689-693.
- Hara, A. and Hirai, H. (1978). Comparative studies on immunochemical properties of female-specific serum protein and egg yolk proteins in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.* **48B**, 389-399.

- Hara, A., Takano, K. and Hirai, H. (1983). Immunochemical identification of female-specific serum protein, vitellogenin, in the medaka, *Oryzias latipes* (teleosts). *Comp. Biochem. Physiol.* **76A**, 135-141.
- Hara, A., Yamauchi, K. and Hirai, H. (1980). Studies on female-specific serum protein (vitellogenin) and egg yolk protein in Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Comp. Biochem. Physiol.* **65B**, 315-320.
- Hori, S.H., Kodama, T. and Tanahashi, K. (1979). Induction of vitellogenin synthesis in goldfish by massive doses of androgens. *Gen. Comp. Endocrinol.* **37**, 306-320.
- Idler, D.R., Hwang, S.J. and Crim, L.W. (1979). Quantification of vitellogenin in Atlantic salmon (*Salmo salar*) plasma by radioimmunoassay. *J. Fish. Res. Bd. Can.* **36**, 574-578.
- Ito, Y., Fujii, T. and Yoshioka, R. (1963). On a phosphoprotein isolated from trout egg. *J. Biochem. (Tokyo)* **53**, 242-243.
- Jared, D.W. and Wallace, R.A. (1968). Comparative chromatography of the yolk proteins of teleosts. *Comp. Biochem. Physiol.* **24**, 437-443.
- Kagawa, H., Takano, K. and Nagahama, Y. (1981). Correlation of plasma estradiol-17 $\beta$  and progesterone levels with ultrastructure and histochemistry of ovarian follicles in the white-spotted char, *Salvelinus leucomaenis*. *Cell Tissue Res.* **218**, 315-329.
- Le Menn, F. (1979). Some aspects of vitellogenesis in a teleostean fish: *Gobius niger* L. *Comp. Biochem. Physiol.* **62A**, 495-500.
- Mano, Y. and Lipmann, F. (1966). Characteristics of phosphoproteins (phosvitins) from a variety of fish roes. *J. Biol. Chem.* **242**, 3822-3833.
- Markert, J.R. and Vanstone, W.E. (1971). Egg proteins of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): chromatographic separation and molecular weights of the major proteins in the high density fraction and their presence in salmon plasma. *J. Fish. Res. Bd. Can.* **28**, 1853-1856.
- 布村 渉・原 彰彦・高野和則・平井秀松 (1983). サケ科魚類肝におけるビテロゲンの免疫組織学的局在. 北大水産彙報 **34**, 79-87.
- 大野哮司 (1979). 卵黄タンパク質遺伝子のエストロゲンによる発現調節. 蛋白質核酸酵素 **24**, 1227-1238.
- 大野哮司 (1981). ヱィテロゲン. 同誌 **26**, 623-633.
- Pan, M.J., Bell, W.J. and Telfer, W.H. (1969). Vitellogenic blood protein synthesis by insect fat body. *Science* **165**, 393.
- Plack, P.A., Pritchard, D.J. and Fraser, N.W. (1971). Egg proteins in cod serum. *Biochem. J.* **121**, 847-856.
- 佐久間兼信 (1923). 生殖細胞の沈降反応及び性別に就いて. 日婦誌 **18**, 1101-1126.
- 佐久間兼信 (1924). 生殖細胞の沈降反応及び性別に就いて. 同誌 **19**, 35-87.
- Schmidt, G., Bartsch, G., Kitagawa, T., Fujisawa, K., Knolle, J., Joseph, J., De Marco, P., Liss, M. and Haschemeyer, R. (1965). Isolation of a phosphoprotein of fish phosphorus content from the eggs of brown brook trout. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **18**, 60-65.
- Uhlenhuth, P.・児玉豊治郎 (1914). 性別反応の研究. 日衛誌 **10**, 13-34.
- Utter, R.M. and Ridgeway, G.J. (1967). A serologically detected serum factor associated with maturity in English sole, *Parophrys vetulus*, and Pacific halibut, *Hippoglossus stenolepis*. *Fishery Bull. Fish. Wildl. Serv. U.S.* **66**, 47-58.
- Wallace, R.A. (1978). Oocyte growth in nonmammalian vertebrates. p. 469-502. In Jones, R.E. (ed.), *The Vertebrate Ovary*. 853p. Plenum, New York and London.
- Wallace, R.A. and Selman, K. (1981). Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *Am. Zool.* **21**, 325-343.
- Wallace, R.A. and Selman, K. (1982). A new procedure for the isolation of intact vitellogenin from teleosts. p. 161. In Richter, C.J.J. and Goos, H.J. Th. (ed.), *Proceedings of the International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*. 256p. Wageningen.
- Wiegand, M.D. (1982). Vitellogenesis in fishes. p. 136-146. In Richter, C.J.J. and Goos, H.J. Th. (ed.), *Proceedings of the International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*. 256p. Wageningen.